Untersuchungen

über den

Gehalt der Blutplasmaproteine an basischen Bestandteilen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

einer

Hohen naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt

von

Karl Lock

aus Ellwangen a. Jagst

ACAD. LAND BAT BIBL.

Tübingen

Druck von H. Laupp jr

1913.

Von der Fakultät angenommen
am 6. März 1913.

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

Vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Thierfelder im physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen ausgeführt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, der Dankbarkeit Ausdruck zu geben, die ich für meinen hochverehrten Lehrer

Herrn Professor Dr. H. Thierfelder

empfinde für das mir während meiner Studienzeit in reichem Maße bewiesene Wohlwollen und für die vielseitige Anregung bei der Ausführung dieser Arbeit.

Gerne danke ich auch an dieser Stelle dem Assistenten des Instituts

Herrn Dr. K. Thomas

für die reichliche Förderung, die ich auch von seiner Seite für meine Arbeit erfahren durfte.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547017_0067

Untersuchungen über den Gehalt der Blutplasmaproteine an basischen Bestandteilen.

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre beschäftigen sich mit der Hydrolyse der Proteinstoffe und der quantitativen Bestimmung der Spaltungsprodukte. Diese Bestimmungen betreffen vorwiegend die Monoaminosäuren, so daß es kaum noch einen bekannteren Eiweißstoff geben dürfte, der nicht nach dieser Richtung untersucht worden wäre. Nicht so häufig sind die Diaminosäuren (Hexonbasen) Gegenstand der quantitativen Analyse gewesen. Das muß um so auffälliger erscheinen, als wir gerade für diese Gruppe der Eiweißspaltungsprodukte in der Methode von Kossel und Kutscher[1]) ein gutes quantitatives Bestimmungsverfahren besitzen, das zur Charakterisierung der einzelnen Proteinstoffe besonders gut geeignetes Zahlenmaterial liefert. Man muß Osborne[2]) nur beistimmen, wenn er auf Grund einer reichen, besonders an pflanzlichen Eiweißstoffen gesammelten Erfahrung mit dieser Methode sagt: „In bezug auf Genauigkeit lassen die Bestimmungen von Histidin, Arginin und Lysin wenig zu wünschen übrig, wenn die analytische Methode sorgfältig und richtig ausgeführt wird" und an einer anderen Stelle: „Die Uebereinstimmung der Werte (die bei mehreren Bestimmungen erhalten werden) ist eine so gute, wie sie bei einer so schwierigen und komplizierten Methode nur erwartet werden kann. Nimmt man alles Beweismaterial zusammen, so ist es in hohem Grade wahrscheinlich, daß bei richtiger Durchführung sehr befriedigende Ergebnisse bei der Bestim-

1) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 165 (1900).

2) Osborne, Leavenworth und Brautlecht, The Americ. Journ. of Physiol. Bd. 23, S. 182 und 196 (1908).

mung der drei Diaminosäuren erhalten werden. Diese Bestimmungen, zusammen mit der Ammoniakbestimmung, bilden zurzeit das beste Hilfsmittel, das zur Charakterisierung der verschiedenen Proteine zur Verfügung steht. Indessen darf nicht vergessen werden, daß gute Werte nur bei Anwendung großer Sorgfalt erhalten werden und daß Uebung in der Handhabung der Methode erforderlich ist.“

Zu den wichtigen tierischen Eiweißstoffen, deren Hexonbasen noch nicht bestimmt worden sind, gehören auch die Blutplasmaproteine Serumalbumin und Fibrinogen (Fibrin). Für den dritten Plasmaeiweißstoff, das Serumglobulin, liegen Angaben vor und zwar aus dem Laboratorium von Skraup; doch stimmen die erhaltenen Werte nur für eine der Basen überein, für die beiden andern weichen sie sehr voneinander ab. Für 100 g getrocknetes Globulin fand Lampel[1]) 3,4 g Histidin, 2,9 g Arginin, 4,2 g Lysin, während Lampel und Skraup[2]) für die gleiche Menge Globulin 1,7 g Histidin, 3,7 g Arginin, 4,3 g Lysin erhielten[3]). Zudem findet sich in keiner der beiden Arbeiten eine Bemerkung darüber, wie das Globulin gewonnen worden ist, so daß man sich kein Urteil über die Reinheit des Materials bilden kann, besonders auch darüber nicht, inwieweit eine Verunreinigung mit Albumin auszuschließen ist.

Im folgenden teile ich meine Arbeit über den Gehalt der Bluteiweißstoffe an Diaminosäuren mit. Die Notwendigkeit, die Untersuchung auch auf das Serumglobulin trotz der schon vorliegenden Angaben auszudehnen, geht aus dem eben Gesagten hervor. Es kam aber noch ein anderes Moment hinzu, welches mich bestimmte, mich auch mit dem Globulin zu beschäftigen. Die Frage nach der Einheitlichkeit des Serumglobulins ist immer noch eine offene. Die Annahme, daß es sich um ein Gemenge handelt, gründet sich darauf, daß es durch Fällung mit Salzen in einzelne Teile zerlegt werden kann

1) Monatsh. f. Chem. Bd. 28, S. 625 (1907).

2) Monatsh. f. Chem. Bd. 30, S. 363 (1909).

3) Lampel und Skraup geben an, daß mehrere Bestimmungen übereinstimmende Resultate ergeben hätten, doch teilen sie nur die Resultate einer Analyse mit.

und daß diese wieder zum Teil in Wasser löslich, zum Teil in Wasser unlöslich sind. Andererseits aber zeigen die auf Grund verschiedener Fällbarkeit und verschiedener Löslichkeit erhaltenen Fraktionen dieselbe Zusammensetzung, dasselbe Lichtbrechungsvermögen, ungefähr dieselbe Gerinnungstemperatur und dieselbe spezifische Drehung. Bei dieser Sachlage schien es angezeigt, zu versuchen, ob nicht vielleicht eine Hexonbasenbestimmung einen Unterschied offenbare. Ich habe deshalb das von Serumalbumin und Fibringlobulin, einem in geringer Menge im Blut vorkommenden Eiweißstoff, getrennte Serumglobulin durch Fällung mit Ammonsulfat in zwei Fraktionen geschieden und jede dieser beiden der Hexonbasenbestimmung unterworfen.

Gewinnung der einzelnen Proteine.

Serumalbumin läßt sich auf Grund seiner schwereren Fällbarkeit durch Neutralsalze von dem Globulin trennen. So gelingt diese Trennung durch Halbsättigung des Serums mit Ammonsulfat, wobei das Globulin gefällt wird, das Albumin in Lösung bleibt. Das Serumalbumin scheint ein Gemenge mehrerer Albumine zu sein. Während nämlich ein Teil zu kristallisieren vermag, erhält man den andern nur amorph. Der kristallisierende Teil wird durch Ammonsulfat leichter gefällt als der amorphe. Ob der amorphe Komponent auch noch aus mehreren verschiedenen Albuminen besteht, ist unentschieden, dagegen liegt kein Grund vor, zu bezweifeln, daß in dem kristallisierten ein einheitlicher Körper vorliegt. Dieses kristallisierte Serumalbumin habe ich der Spaltung unterworfen. Die Darstellung geschah im wesentlichen nach den Angaben von Gürber[1]), Pemsel[2]) und Moll[3]) in folgender Weise. Das Serum (Pferdeblutserum) wird mit n/10-Salzsäure (und zwar auf 100 ccm 25 ccm n/10-Säure) und darauf mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt und nach mehrstündigem Stehen fil-

1) Sitzungsber. der phys.-med. Ges. zu Würzburg 1894, S. 143. Michel, Verh. der phys. med. Ges. zu Würzburg N. F. 29, 117 (1895).

2) Bei Krieger, Diss. Straßburg 1899.

3) Beitr. zur chem. Physiol. und Pathol. 4, 567 (1904).

triert. In einzelne kleine abgemessene Proben des Filtrats ließ ich dann aus einer Bürette Mengen von n/5-Schwefelsäure fließen und zwar zu der einen gerade bis zum Eintritt einer bleibenden Trübung, zu anderen etwas mehr, zu anderen etwas weniger in wechselnden gemessenen Mengen. Nachdem sich dann nach einiger Zeit ruhigen Stehens herausgestellt hatte, in welcher Probe die Kristallisation am besten erfolgt war, wurde die Hauptmenge gemessen und mit der entsprechenden Quantität n/5-Schwefelsäure versetzt. Die abgeschiedene Substanz wurde dann abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und der Rückstand mit Wasser behandelt. Dabei ging die Hauptmenge in Lösung, während eine kleine Menge ungelöst blieb und durch Filtration entfernt wurde. Ich stellte nun wieder fest, welche Menge gesättigter Ammonsulfatlösung die beste Kristallisation hervorrief, indem ich gemessene Proben des Filtrats mit wechselnden Mengen der Salzlösung versetzte und fügte dann zu der Hauptmenge die geeignete Quantität hinzu. Nachdem dann die mikroskopische Untersuchung die Abwesenheit jeglicher amorpher Beimengung ergeben hatte und die völlige Löslichkeit der Abscheidung in Wasser festgestellt worden war, wurde die wässrige Lösung der Kristalle in heißen Alkohol gegossen und das Koagulum durch Waschen mit Wasser vom Alkohol und der Hauptmenge des Ammonsulfats befreit. Darauf nahm ich es vom Filter, zerrieb es in der Reibschale, wusch es nun auf dem Filter mit Wasser bis zum Ausbleiben der Ammoniak- und Schwefelsäurereaktion und zuletzt mit Alkohol und Aether aus.

S e r u m g l o b u l i n. Zu seiner Darstellung wurde das Serum durch Versetzen zweier Volumina mit 5,2 Vol. Wasser und 2,8 Vol. gesättigter Ammonsulfatlösung auf 28% Sättigung mit Ammonsulfat gebracht und das ausfallende Fibringlobulin entfernt. Das Filtrat wurde durch Zusatz von Ammonsulfat auf 34% Sättigung mit diesem Salz gebracht, die Fällung (Globulinfraktion I) abfiltriert und aus dem Filtrat Globulinfraktion II durch Zusatz von Ammonsulfat bis zu 40% Sättigung zur Abscheidung gebracht. Zur Reinigung habe ich beide Fraktionen zu gleichem Volumen in Wasser gelöst, sie aus den Lösungen nochmals durch Zusetzen der ent-

sprechenden Mengen Ammonsulfat abgeschieden und Lösung und Fällung wiederholt, bis die Lösung bei Ammonsulfatsättigung von 28 bzw. 34 % keine Fällung mehr gab und nach Ausfällung der gewünschten Globulinfraktion die Proben der Filtrate beim Kochen klar blieben, also eiweißfrei waren. Die Fraktionen wurden dann nochmals gelöst und die Lösungen aufgekocht. Das entstehende Koagulum wusch ich mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der Ammoniak- und Schwefelsäurereaktion, darauf mit Alkohol und Aether aus. Die so erhaltene Fraktion II war jedenfalls frei von Albumin, ob auch die Fraktion I von Fibringlobulin muß dahingestellt bleiben, doch ist dieser Eiweißkörper von vornherein in nur geringer Menge im Blutserum vorhanden.

Fibrinogen. Es kam als Fibrin zur Untersuchung. Dieses wurde durch Schlagen des Pferdeblutes gewonnen und mit Wasser bis zur Farblosigkeit behandelt, mit Aceton von Wasser befreit und im Exsikkator getrocknet.

Untersuchungsmethode.

Das lufttrockene Eiweiß wurde in einer Reibschale zu einem feinen Pulver zerrieben, durch ein feines Sieb getrieben und in gut schließenden Flaschen aufgehoben. In einzelnen Proben bestimmte ich den Gehalt der bis zum konstanten Gewicht getrockneten Substanz an Stickstoff und Asche. Bei der Hexonbasenbestimmung benützte ich die von Kossel[1]) und von Steudel[2]) angegebenen Modifikationen der ursprünglichen Methode und verfuhr im einzelnen unter Anlehnung an die von Weiß[3]) und von Steudel[4]) gegebenen Vorschriften in folgender Weise.

1. Hydrolytische Spaltung.

Etwa 40 g lufttrockenes Eiweiß wurden mit einer Mischung der dreifachen Menge seines Gewichts konz. Schwefelsäure

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 49, S. 318 (1906).

2) Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 37, S. 219 (1902/03) und Bd. 44, S. 157 (1905).

3) Zeitschr. f. physol. Chemie Bd. 52, S. 107 (1907).

4) Biochem. Arbeitsmethoden Bd. II, S. 498, 1910.

und der sechsfachen Menge seines Gewichts Wasser bis zur völligen Lösung zur Vermeidung späteren Schäumens auf dem Wasserbad erhitzt, dann 14 Stunden im Oelbad am Rückflußkühler gekocht. Das mit Wasser verdünnte Hydrolysat filtrierte ich, füllte zu einem Liter auf und verwendete zweimal 10 ccm zur Ermittelung des Gesamtstickstoffes nach Kjeldahl[1]). Aus diesem Stickstoff berechnete ich die Menge des in den Versuch eingeführten trockenen Eiweißes, dessen Stickstoffgehalt ermittelt worden war.

2. Entfernung des Huminstickstoffes. Bestimmung des Ammoniaks.

Die Flüssigkeit wurde zum Sieden erhitzt und durch Zusatz einer kochend heißen gesättigten Aetzbarytlösung vom größten Teile der Schwefelsäure befreit. Das Bariumsulfat, welches einen großen Teil der sogen. Huminstoffe mitreißt, saugte ich ab, kochte den Niederschlag mit Wasser aus, saugte wieder ab und wiederholte Auskochen und Absaugen noch zweimal. Schließlich wusch ich noch so lange mit kochendem Wasser aus, bis das Filtrat mit Phosphorwolframsäure keine Fällung mehr gab. Ich dampfte nun die gesamten Filtrate auf ein Liter ein und bestimmte wieder den Stickstoff in 10 ccm. Durch Subtraktion der gefundenen Stickstoffmenge von der Gesamtstickstoffmenge erhält man den Huminstickstoff I. Zur Ermittelung des vorhandenen Ammoniaks wurden 100 ccm in einem Rundkolben mit Barytwasser neutralisiert und nach Zusatz von etwa 5 g fein zerriebenen und mit Wasser aufgeschwemmten Bariumkarbonats unter Durchleiten von Wasserdampf destilliert. Das in n/10-Schwefelsäure aufgefangene Ammoniak wird unter Benutzung von Methylorange als Indikator titrimetrisch bestimmt. Nach Entfernen des Ammoniak aus der Hauptmenge durch Kochen in einer Schale nach Neutralisation mit Aetzbaryt und Zusatz von Bariumkarbonat brachte ich Kolben- und Schaleninhalt gemeinsam auf ein Filter, kochte den

1) Alle Kjeldahlbestimmungen wurden doppelt ausgeführt, alle Stickstoffwerte sind das Mittel gutstimmender Doppelanalysen.

Filterrückstand wiederholt mit Wasser aus, säuerte die vereinigten Filtrate mit Schwefelsäure an, dampfte ein und füllte, wenn nötig nach nochmaliger Filtration, zum Liter auf. Eine Stickstoffbestimmung in einer abgemessenen kleinen Menge ergibt unter Berücksichtigung des gefundenen Ammoniaks die Menge des noch weiterhin entfernten Huminstickstoff II.

3. Fällung von Histidin und Arginin als Silberverbindungen.

Die schwefelsaure Lösung wird mit kochend heißer Silbersulfatlösung allmählich unter kräftigem Umschütteln versetzt, bis ein mit einem Glasstab herausgenommener Tropfen in Barytwasser, das sich in einem auf schwarzer Unterlage stehenden Uhrglas befindet, nicht mehr einen weißen oder hellgelben, sondern braungelben Niederschlag hervorruft. Jetzt kühlte ich die Flüssigkeit gut ab, sättigte sie mit gepulvertem Aetzbaryt (d. h. fügte diese Substanz so lange hinzu, bis auch nach längerem Umschwenken etwas ungelöst blieb), ließ absitzen und saugte ab. Der Niederschlag wurde mit reinem Seesand in der Reibschale mit Barytwasser zerrieben, abgesaugt, mit barythaltigem Wasser ausgewaschen und dann samt Filter in schwefelsäurehaltigem Wasser bis zur sauren Reaktion aufgeschwemmt. Im Niederschlag befinden sich Histidin und Arginin, im Filtrat Lysin.

4. Weitere Behandlung des Niederschlags.

Der in schwefelsäurehaltigem Wasser aufgeschwemmte Niederschlag wurde durch Schwefelwasserstoff zersetzt, durch Kochen vom überschüssigen Schwefelwasserstoff befreit, abgesaugt, wiederholt mit Wasser ausgekocht und mit heißem Wasser gewaschen, bis das Filtrat mit Phosphorwolframsäure keine Trübung mehr gab. Die vereinigten Filtrate dampfte ich auf ein Liter ein, bestimmte in kleinen gemessenen Mengen den Stickstoff und erfuhr so, wieviel Stickstoff durch Silber und Baryt gefällt worden war. Die Hauptmenge wurde mit Barytwasser neutralisiert, mit einer Lösung von Barium-

nitrat versetzt, solange noch ein Niederschlag entstand, und filtriert, der Niederschlag ausgewaschen. Das auf 250 ccm eingeengte und mit Salpetersäure angesäuerte Filtrat versetzte ich so lange mit einer konz. Silbernitratlösung, bis ein Tropfen in Barytwasser einen braungelben Niederschlag hervorrief. Jetzt wurde mit Barytwasser schwach sauer oder eben neutral gemacht, nach Zufügen von in Wasser fein verteiltem Bariumkarbonat zum einmaligen Aufkochen erhitzt, nach dem Erkalten filtriert und mit schwach barythaltigem Wasser bis zum Verschwinden der Salpetersäurereaktion ausgewaschen. Der Niederschlag enthielt das Histidin als Silberverbindung, das Filtrat nebst Waschwasser das Arginin.

Filtrat und Waschwasser werden nicht vereinigt, sondern beide für sich nach Pauly[1]) mittelst der Diazoreaktion auf Hidistin geprüft. Die für die Reaktion bestimmten Proben sind zunächst durch Schwefelwasserstoff von Silber zu befreien. Bei der außerordentlich großen Empfindlichkeit der Reaktion ist ein schwacher Ausfall nicht zu berücksichtigen, da eine Wiederholung der Silberfällung in diesem Falle nach meiner Erfahrung ergebnislos verläuft. Tritt aber die Reaktion kräftig ein, so habe ich die Flüssigkeit entweder bei niedriger Temperatur im Exsikkator eingeengt und etwa auftretende Abscheidungen dem Histidinniederschlag zugefügt oder aber (in Versuch I) sie zunächst weiter verarbeitet bis zur Argininstickstoffbestimmung und wieder dem Verfahren zur Trennung von Histidin und Arginin unterworfen. In diesem Versuche erwies es sich nötig, den ganzen Prozeß noch einmal zu wiederholen; daher die Ausdrücke 1., 2. und 3. Histidinlösung.

5. Bestimmung des Histidins.

Den Niederschlag versetzte ich mit schwefelsäurehaltigem Wasser in der Hitze bis zur sauren Reaktion, zerlegte ihn mit Schwefelwasserstoff, entfernte den überschüssigen Schwefelwasserstoff durch Kochen, filtrierte das Schwefelsilber ab und kochte es mit Wasser aus, bis Phosphorwolframsäure keine Reaktion mehr gab. Das Filtrat wurde auf 250 ccm gebracht. Eine Stickstoffbestimmung in einem aliquoten Teil diente zur Berechnung des vorhandenen Histidins. Die übrige Menge der Flüssigkeit wird mit Aetzbaryt in der Hitze von der Schwefelsäure, durch Kohlensäure von überschüssigem Baryt

1) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 516 (1904).

befreit, eingeengt und filtriert; der Niederschlag wiederholt mit heißem Wasser gewaschen und das Filtrat auf etwa 10 ccm gebracht, nachdem etwaige Spuren von Baryt durch wenige Tropfen verdünnter Schwefelsäure entfernt worden waren. Ich fällte nun durch eine in geringem Ueberschuß hinzugefügte heiße alkoholische Pikrolonsäurelösung das Histidin aus, filtrierte das Pikrolonat ab. Nach dreitägigem Stehen trocknete ich es bei 100° und wog es. Aus der Mutterlauge schied sich nach dem Eindampfen in manchen Fällen noch etwas Pikrolonat ab, welches ebenfalls abfiltriert, getrocknet und gewogen wurde. Das Filtrat befreite ich nach dem Versetzen mit Schwefelsäure durch Extrahieren mit Aether von der Pikrolonsäure, entfernte die Schwefelsäure durch Barytwasser, das überschüssige Barium durch Kohlensäure und fällte nach starker Einengung nochmals mit Pikrolonsäure. Die so gewonnenen Pikrolonate wurden auf ihren Schmelzpunkt[1]) untersucht und wenn dieser mit dem Schmelzpunkt des Histidinspikrolonats, welcher nach Steudel bei 225° liegt, in genügender Uebereinstimmung sich befand, miteinander vereinigt. Waren die Schmelzpunkte nicht befriedigend, so wurde nochmals umkristallisiert, getrocknet und wieder gewogen. Aus der Menge des gewogenen Histidinpikrolonats ($C_6H_9N_3O_2 . C_{10}H_8N_4O_5$) wurde die Menge des Histidins berechnet.

6. Bestimmung des Arginins.

Filtrat und Waschwasser der Histidinfällung sättigte ich mit Aetzbaryt, saugte den Niederschlag ab, zerrieb ihn samt dem Filter nach Zufügen von Seesand mit Barytwasser, brachte

1) Bei den weiter unten folgenden analytischen Daten fehlt wiederholt eine Angabe über den Schmelzpunkt des isolierten Histidinpikrolonats. Damit soll nicht etwa gesagt sein, daß er nicht bestimmt worden wäre oder daß er nicht gestimmt hätte. Der Grund für das Fehlen liegt darin, daß der Eintrag in das Protokollbuch versäumt wurde. Alle meine Gewichtsangaben von Histidinpikrolonaten beziehen sich auf Präparate, welche den richtigen oder wenigstens einen annähernd richtigen Schmelzpunkt gaben und dasselbe gilt von den Argininpikrolonaten und den Lysinpikraten.

ihn wieder auf das Filter und wusch mit Barytwasser bis zum Verschwinden der Salpetersäurereaktion aus. Jetzt wurde er mit schwefelsäurehaltigem Wasser unter Rühren bis zur sauren Reaktion versetzt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Schwefelsilber nach Wegkochen des Schwefelwasserstoffs abfiltriert und mit Wasser ausgekocht und ausgewaschen. Die vereinigten Filtrate dampfte ich auf 500 ccm ein und bestimmte in abgemessenen kleinen Mengen den Stickstoff. Der gefundene Wert diente zur Berechnung des Arginin. Die übrige Menge wurde genau in der beim Histidin beschriebenen Weise von Schwefelsäure und Barium befreit und auf 10 ccm gebracht. Ich fällte nun durch Zusatz der berechneten Menge in wenig heißem Alkohol gelöster Pikrolonsäure, filtrierte nach einigen Tagen ab und wusch mit wenig Wasser aus. Die Mutterlauge wurde, wie bei Histidin beschrieben, weiter verarbeitet. Die einzelnen Pikrolonate wurden bei 110° getrocknet, gewogen und auf ihre Schmelzpunkte untersucht. Wenn diese sich nicht in befriedigender Uebereinstimmung mit dem Schmelzpunkt des Argininpikrolonats, welcher nach Steudel bei 225° liegt, befanden, so wurde nochmals umkristallisiert. Aus der Menge des gewogenen Argininpikrolonats $C_6H_{14}N_4O_2 . C_{10}H_8N_4O_5$ wurde die Menge des Arginin berechnet. Was das Fehlen von Angaben über den Schmelzpunkt mancher Argininpikrolonate unter den weiter unten folgenden analytischen Daten betrifft, so sei auf die Fußnote S. 15 verwiesen.

7. Bestimmung des Lysin.

Das Histidin- und Arginin-freie Filtrat wird durch Ansäuern mit Schwefelsäure von Baryt, durch Einleiten von Schwefelwasserstoff von Silber befreit und filtriert; der Filterrückstand mit Wasser vollständig ausgekocht und ausgewaschen, Filtrat und Waschwasser auf 500 ccm gebracht. Eine Stickstoffbestimmung dient zur Kontrolle, ob das Auswaschen des Niederschlags vollständig erfolgt ist. Jetzt fügte ich Schwefelsäure bis zu 4 Vol.-% hinzu und fällte mit Phosphorwolframsäure, bis eine filtrierte Probe nach weiterem Zusatz des Fällungsmittels 10 Sekunden klar blieb.

Nach 24 stündigem Stehen saugte ich den Niederschlag, welcher das Lysin enthielt, ab, zerrieb ihn in einer Reibschale mit 4 Vol.-%iger Schwefelsäure, saugte wieder ab und wusch mit Schwefelsäure derselben Konzentration aus. Eine Bestimmung des Stickstoffs in den vereinigten und eingeengten Filtraten ergab die Menge des von Phosphorwolframsäure nicht gefällten Stickstoffs. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wird nach dem Vorschlag von Kossel und Weiß[1]) in Aceton gelöst, die Acetonlösung mit gesättigter Aetzbarytlösung alkalisch gemacht, das Barytsalz abgesaugt, nochmals mit ätzbarythaltigem Wasser ausgekocht, wieder abgesaugt und mit heißem Wasser völlig ausgewaschen. Die alkalischen Filtrate behandelte ich sofort mit Kohlensäure, dampfte ein, filtrierte von Bariumkarbonat ab und brachte das Filtrat auf 500 ccm. Nachdem in abgemessenen kleinen Mengen Stickstoffbestimmungen ausgeführt, wurde die übrige Flüssigkeit fast zur Trockene gebracht, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, die Lösung von Bariumkarbonat abfiltriert, auf wenige ccm eingedampft und mit gesättigter alkoholischer Pikrinsäurelösung unter Kontrolle der Lakmustüpfelprobe[2]) neutralisiert. Nach 24 Stunden filtrierte ich das Pikrat auf einem Goochtiegel ab, wusch mit wenig absolutem Alkohol nach, trocknete bei 100° und wog. Ergab sich bei einer Bestimmung des Zersetzungspunktes, daß dieser mit dem des Lysinpikrats, welcher bei 252° liegt, noch nicht übereinstimmt, so wurde das Pikrat nochmals aus heißem Wasser umkristallisiert, abfiltriert, gewogen und der Schmelzpunktbestimmung unterworfen. Die Mutterlauge befreite ich nach Verdunsten des Alkohols und Ansäuren mit Schwefelsäure bis zu 4 Vol.-% mittelst Aether von der Pikrinsäure und fällte nach Entfernung des Aethers wieder mit Phosphorwolframsäure. Es entstand dabei zwar noch ein kleiner Niederschlag, aus dem aber in keinem Falle noch Lysinpikrat gewonnen

1) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 165 (1910).

2) Ich fand dieses Verfahren zweckmäßiger als das vorgeschriebene, nach dem man, um einen Ueberschuß von Pikrinsäure zu vermeiden, die Pikrinsäurelösung nach und nach in kleinsten Mengen so lange zusetzen soll, als die Bildung eines Niederschlags zu beobachten ist.

werden konnte. Aus dem Gewicht des Lysinpikrats $C_6H_{14}N_2O_2 . C_6H_2(NO_2)_3OH$ wurde das Lysin berechnet. Ueber das Fehlen von Angaben über den Zersetzungspunkt einzelner Lysinpikrate unter den weiter unten folgenden analytischen Daten siehe die Fußnote auf S. 15.

8. Identifizierung der isolierten Salze.

Die Identifizierung der isolierten und zur Wägung gebrachten Salze nahm ich in folgender Weise vor.

a) Lysinpikrat. Es wurde entweder eine abgewogene Menge mit Salzsäure zerlegt, die Pikrinsäure mit Aether extrahiert, die ätherische Lösung verdunstet und der Rückstand gewogen, oder ich ließ die von Pikrinsäure mittels Aether befreite salzsaure Lysinlösung eindampfen und dann im Vakuumexsikkator über Natriumchlorid-haltiger Schwefelsäure krystallisieren. Der kristallisierte Rückstand wurde mit Alkohol zerrieben, auf einen Goochtiegel gebracht, mit absolutem Alkohol und Aether gewaschen, im Chorcalciumexsikkator neben Natriumhydroxyd getrocknet und dann direkt auf seinen Chlorgehalt untersucht. Außerdem wurde auch der Schmelzpunkt des so erhaltenen Chlorids bestimmt. Lysindichlorid schmilzt nach Henderson[1]) bei 192—193°.

b) Argininpikrolonat. Es wurde mit Schwefelsäure zerlegt und mit Aether von der Pikrolonsäure befreit. Nach Entfernung der Schwefelsäure durch Barytwasser, des überschüssigen Bariums durch Kohlensäure, wurde eingedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, der Rest des Bariumkarbonats abfiltriert und das Filtrat mit Salpetersäure neutralisiert. Das beim Eindampfen zuerst auf dem Wasserbad, dann im Vakuum zurückbleibende kristallisierende Nitrat löste sich bis auf einige minimale unwägbare Flöckchen in Wasser. Das Filtrat engte ich wieder ein und entfernte bei Aufnahme in Wasser etwa zurückbleibende Flöckchen wieder durch Filtrieren. Einengen und Aufnehmen wurde unter Umständen noch einmal wiederholt, bis der Rückstand sich völlig klar in Wasser löste. Die gesamte, auf diese Weise entfernte Substanz war jedoch eine unwägbare. Nun wurde

1) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 321 (1900).

mit Kupferhydroxyd gekocht, filtriert und das Filtrat etwas eingedampft. Die nach kurzem Stehen sich abscheidenden Kristalle wurden abfiltriert und nach dem Trocknen ohne weiteres der Kristallwasser- und Kupferbestimmung unterworfen.

Es mag hier gleich erwähnt werden, daß in einigen Fällen der gefundene Kristallwassergehalt nicht auf 3 Mol. Wasser, wie er für das Argininkupfernitrat angegeben ist, stimmte, sondern erheblich niedriger gefunden wurde, während das entwässerte Salz den richtigen Kupfergehalt besaß. Das Präparat, bei dem der Wasserverlust beim Erhitzen im Trockenschrank auf 110° nur 7,12 %, statt der für 3 Mol. Wasser verlangten 9,16 % betrug, hatte einige Stunden, das andere, welches nur 4,11 % Verlust zeigte, 24 Stunden im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure gestanden. Die andern Präparate, welche einen auf 3 Mol. Kristallwasser stimmenden Wasserverlust beim Erhitzen auf 110° erlitten, waren allerdings auch vorher im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet worden. Daß längeres Aufbewahren von Argininkupfernitrat über Schwefelsäure einen Kristallwasserverlust zur Folge hat, ist von H e d i n [1]) beobachtet worden. Er fand in einem Präparat, das etwa 3 Wochen über Schwefelsäure gestanden hatte, nur noch 2,66 % Kristallwasser.

c) H i s t i d i n p i k r o l o n a t. Leider kann nur über das Ergebnis eines einzigen Identifizierungsversuchs berichtet werden, da das Gefäß, in dem sich verschiedene Histidinpikrolonate zu gemeinsamer Bearbeitung befanden, zerbrochen wurde. Das Histidinpikrolonat, welches aus dem Albumin (Spaltung B) gewonnen worden war, wurde in derselben Weise, wie es beim Lysinpikrat beschrieben worden, in das schön kristallisierende Chlorid verwandelt. Dies habe ich zunächst (nicht um es zu reinigen, sondern um es vollständig in das Dichlorid zu verwandeln) in konzentrierter Salzsäure gelöst und aus dieser Lösung mit Alkohol und Aether gefällt. Es schied sich zunächst ölig ab, wurde aber alsbald ganz kristallinisch. Die über Schwefelsäure getrockneten Kristalle wurden einer Chlorbestimmung unterworfen.

1) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 186 (1895).

Die einzelnen Untersuchungen.

1. Kristallisiertes Serumalbumin.

Es enthielt bei 110° bis zu konstantem Gewicht getrocknet und auf aschefreie Substanz berechnet 16,5 % Stickstoff.

0,2480 g verbrauchten 29,11 ccm n/10-Schwefelsäure = 0,04078 g Stickstoff = 16,44%.

0,2348 g verbrauchten 27,795 ccm n/10-Schwefelsäure = 0,03894 g Stickstoff = 16,58%.

Der Aschegehalt der bis zum konstanten Gewicht getrockneten Substanz betrug im Mittel von 2 Bestimmungen 0,04054%.

Versuch A. Etwa 55 g lufttrockenes Albumin wurden in der angegebenen Weise gespalten. Das filtrierte und zu einem Liter aufgefüllte Hydrolysat enthielt (2 Kjeldahlbestimmungen mit je 10 ccm) 7,359 g Stickstoff. In 980 ccm waren also noch 7,2118 g Stickstoff vorhanden. Auf diese Stickstoffmenge bzw. die ihm entsprechende Menge trockenen aschefreien Eiweißes (43,7 g) wurden alle Berechnungen bezogen.

Nach Entfernung des Huminstickstoffes I sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 6,907 g Stickstoff, in 980 ccm 6,7689 g vorhanden.

Nach Entfernung von Ammoniak und Huminstickstoff II, welche in diesem Versuch nicht einzeln bestimmt wurden, sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 6,708 Stickstoff, also in 980 ccm 6,5738 g vorhanden.

In einem Liter der Lösung, welche den durch Baryt und Silber fällbaren Stickstoff enthält (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) sind 1,454 g Stickstoff in 960 ccm, also 1,3959 g vorhanden.

In 250 ccm der ersten Histidinlösung (2 Kjehldahlbest. mit je 25 ccm) sind 0, 1013 g Stickstoff, in 200 ccm also 0,0810 g vorhanden. In 250 ccm der zweiten Histidinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 40 ccm) sind 0,1178 g Stickstoff, in 170 ccm also 0,0801 g vorhanden. In 250 ccm der dritten Histidinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 40 ccm) sind 0,1142 g Stickstoff, in 170 ccm also 0,0777 g Stickstoff vorhanden. Die Menge des gewogenen Histidinpikrolonats betrug 1,619 g.

In 500 ccm der Argininlösung (2 Kjeldahlbest. zu je 40 ccm) sind 0,5489 g Stickstoff, in 420 ccm also 0,4610 g vor-

handen. Die Menge des gewogenen Pikrolonats des Arginin betrug 3,431 g.

In 500 ccm der Lösung, welche den durch Baryt und Silber nicht fällbaren Stickstoff enthält (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) sind 5,075 g N., in 480 cc also 4,872 g vorhanden. In 250 cc der Lysinlösung (3 Kjeldahlbestimmungen mit je 10 ccm) sind 0,8405 g Stickstoff, in 220 ccm also 0,7398 g vorhanden.

Die Menge des gewogenen Lysinpikrats betrug 7,144 g.

Identifizierung des Arginins. Sie wurde gemeinsam mit den aus Globulin I (Hydrolyse A und B) und Globulin II (Hydrolyse B) gewonnenen Präparaten vorgenommen und zwar durch Ueberführung in die Kupfernitratverbindung. 0,1384 g Substanz verloren bei 110° 0,0135 g Wasser = 9,75% und lieferten beim Glühen[1]) 0,0179 g CuO = 14,33% CuO (auf kristallwasserfreie Substanz berechnet).

$(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu(NO_3)_2 + 3H_2O$ verlangen 9,16% Wasser.
$(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu(NO_3)_2$ verlangen 14,86% CuO.

Versuch B. Etwa 40 g lufttrockenes Albumin wurden gespalten. Das filtrierte und zu einem Liter aufgefüllte Hydrolysat enthielt (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 5,612 g Stickstoff, in 980 ccm waren also noch 5,4998 g Stickstoff enthalten. Auf diese Stickstoffmenge bzw. auf die ihr entsprechende Menge trockenen, aschefreien Eiweißes (33,33 g) sind alle Berechnungen bezogen worden.

Nach Entfernung des Huminstickstoffes I sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 5,384 g Stickstoff vorhanden und in diesen sind (auf Grund einer Bestimmung in 100 ccm) 0,2847 g Ammoniakstickstoff. In 880 ccm sind noch 4,9916 g Stickstoff vorhanden.

Nach Entfernung von Ammoniak und Huminstickstoff II sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 5,088 g[2]) vorhanden, in 980 ccm also 4,9862 g.

In einem Liter der Lösung, welche den durch Baryt und Silber fällbaren Stickstoff enthält (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) sind 1,0725 g Stickstoff vorhanden, in 960 ccm also 1,0296 g.

1) Der Glührückstand wurde mittels Salpetersäure völlig in CuO verwandelt.

2) Da dieser Wert höher ist, als der vor der Entfernung des Ammoniaks erhaltene, so muß ein analytischer Fehler vorliegen.

In 250 ccm der Histidinlösung (2 Kjeldahlbest. zu je 30 ccm) sind 0,3098 g Stickstoff vorhanden, in 190 ccm also noch 0,2354 g. Die Menge des gewogenen Histidinpikrolonats (nach Umkristallisation) beträgt 1,701 g. Schmelzpunkt 230°.

In 500 ccm der Argininlösung (2 Kjeldahlbest. zu je 20 ccm) sind 0,4692 g Stickstoff vorhanden, in 460 ccm also noch 0,4317 g. Die Menge des gewogenen Argininpikrolonats beträgt 3,1970 g. Sp. 226°.

In 500 ccm der Lösung, welche den durch Baryt und Silber nicht fällbaren Stickstoff enthält (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm), sind 3,764 g Stickstoff vorhanden, in 480 ccm also 3,6139 g.

In 500 ccm der Lysinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) sind 0,6652 g Stickstoff vorhanden, in 460 ccm also noch 0,6122 g. Die Menge des gewogenen Lysinpikrats (nach Umkristallisieren) beträgt 6,149 g. Smp. 250°.

Identifizierung des Histidins als Histidindichlorid.

0,1040 g Substanz gaben nach Carius 0,1323 g AgCl = 0,03273 g Cl = 31,47% Cl.

$C_6H_9N_3O_2 . 2HCl$ verlangen 31,14% Cl.

Identifizierung des Arginins als Argininkupfernitrat.

0,1127 g Substanz verloren bei 110° 0,0103 g Wasser = 9,14% und lieferten 0,0149 g CuO = 14,55% CuO (auf kristallwasserfreie Substanz bez.).

$(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu(NO_3)_2 + 3H_2O$ verlangen 9,16% H_2O.

$(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu(NO_3)_2$ verlangen 14,86% CuO.

Identifizierung des Lysinpikrats.

1,1260 g bei 100° getrockneter Substanz lieferten 0,6865 g bei 100° getrockneter Pikrinsäure = 61,07%.

$C_6H_1 N_2O_2 . C_6H_2(NO_2)_3OH$ verlangen 60,96% Pikrinsäure.

2. Serumglobulin (Fraktion I).

Es enthielt bei 110° bis zu konstantem Gewicht getrocknet und auf aschefreie Substanz berechnet 15,30% Stickstoff.

0,5730 g lufttrockne Substanz verloren bei 110° getrocknet 0,0405 g H_2O = 7,07%.

0,5422 g lufttrockne Substanz neutralisierten nach Kjeldahl 54,8 ccm n/10-H_2SO_4 = 0,0767 g Stickstoff = 14,16%.

0,8343 g lufttrockne Substanz neutralisierten nach Kjeldahl 85,1 ccm n/10-Schwefelsäure = 0,1191 g Stickstoff = 14,28%.

Der Aschegehalt der bis zum konstanten Gewicht getrockneten Substanz betrug im Mittel von 2 Bestimmungen 0,1212%.

Versuch A. Etwa 40 g lufttrockenes Globulin I wurden gespalten. Das filtrierte und zu einem Liter aufgefüllte Hydrolysat enthielt (2 Kjeldahlbest. zu je 10 ccm) 5,52 g Stickstoff, in 980 ccm waren also noch 5,4096 g vorhanden. Auf diese Stickstoffmenge bzw. auf die ihr entsprechende Menge trockenen, aschefreien Eiweißes (35,35 g) sind alle Berechnungen bezogen worden.

Nach Entfernung des Huminstickstoffs I sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 4,996 g Stickstoff vorhanden und von diesen sind (auf Grund einer Bestimmung in 100 ccm) 0,303 g Ammoniakstickstoff. In 880 ccm sind also noch 4,8658 g Stickstoff vorhanden.

Nach Entfernung des Ammoniaks und des Huminstickstoffs II sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 4,599 g Stickstoff vorhanden, in 980 ccm also 4,5071 g.

In einem Liter der Lösung, welche den durch Baryt und Silber fällbaren Stickstoff enthielt (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) sind 0,7995 g Stickstoff vorhanden, in 960 ccm also noch 0,7675 g.

In 250 ccm der Histidinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 30 ccm) sind 0,1284 g Stickstoff vorhanden, in 190 ccm also noch 0,0976 g. Die Menge des gewogenen Histidin-Pikrolonates (nach Umkristallisieren) beträgt 0,5437 g.

In 500 ccm der Argininlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) sind 0,4727 g Stickstoff vorhanden, in 460 ccm also noch 0,4349 g. Die Menge des gewogenen Argininpikrolonats beträgt 2,7581 g.

In 501 ccm der Lösung, welche den durch Baryt und Silber nicht fällbaren Stickstoff enthält (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm), sind 3,6357 g Stickstoff vorhanden. In 481 ccm also noch 3,4907 g.

In 250 ccm der Lysinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) sind 0,4090 g Stickstoff vorhanden, in 230 ccm also noch 0,3763 g. Die Menge des gewogenen Lysinpikrats (nach Umkristallisieren) betrug 3,4750 g. Smp. 250°.

Identifizierung des Arginins als Argininkupfernitrat siehe bei Albumin (Hydrolyse A).

Identifizierung des Lysins. Sie wurde gemeinsam mit den aus Globulin I (Hydrolyse B) und Globulin II (Hydrolyse B) gewonnenen Präparaten vorgenommen und zwar als Lysindichlorid.

0,1376 g Substanz gaben nach Carius 0,1818 g AgCl = 0,04495 g Cl = 32,67% Cl. Smp. 195—196°.

$C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl$ verlangen 32,42% Cl.

Versuch B. Etwa 40 g lufttrockenes Globulin I wurde gespalten. Das filtrierte und zu einem Liter aufgefüllte Hydrolysat enthielt (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 5,618 g Stickstoff. In 980 ccm sind also noch 5,5056 g Stickstoff vorhanden. Auf diese Stickstoffmenge bzw. auf die ihr entsprechende Menge trockenen, aschefreien Eiweißes (36,0 g) sind alle Berechnungen bezogen worden.

Nach Entfernung des Huminstickstoffes I sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 5,073 g Stickstoff vorhanden und von diesem sind (auf Grund einer Bestimmung in 100 ccm) 0,3539 g Ammoniakstickstoff. In 880 ccm sind also noch 4,9362 g Stickstoff vorhanden.

Nach Entfernung des Ammoniaks und des Huminstickstoffs II sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 4,682 g Stickstoff vorhanden, in 980 ccm also noch 4,5884 g.

In einem Liter der Lösung, welche den durch Baryt und Silber fällbaren Stickstoff enthielt (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) sind 0,7985 g N vorhanden, in 960 ccm also noch 0,7666 g. Die weitere Bearbeitung dieser Lösung ist verunglückt.

In einem Liter der Lösung, welche den durch Baryt und Silber nicht fällbaren Stickstoff enthielt (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) waren 3,6775 g Stickstoff vorhanden, in 980 ccm also noch 3,5304 g.

In 250 ccm der Lysinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) sind 0,4426 g Stickstoff vorhanden, in 230 ccm also noch 0,4069 g. Die Menge des zur Wägung gebrachten Lysinpikrats (nach Umkristallisieren) betrug 3,6400 g. Smp. 248 bis 252°.

Identifizierung des Arginins als Argininkupfernitrat siehe bei Albumin (Hydrolyse A).

Identifizierung des Lysins als Lysindichlorid siehe bei Globulin I (Hydrolyse A).

3. Serumglobulin (Fraktion II).

Es enthielt bei 110° bis zum konstanten Gewicht getrocknet und auf aschefreie Substanz berechnet 15,78% Stickstoff.

0,4990 g lufttrockne Substanz verloren bei 110° getrocknet 0,0845 g H_2O. = 16,93%.

0,5030 g lufttrockne Substanz verbrauchen bei der Kjeldahlbest. 47,1 ccm n/10-Schwefelsäure = 0,0659 g Stickstoff = 13,10%.

Der Aschegehalt der bis zum konstanten Gewicht getrockneten Substanz betrug im Mittel von 2 Bestimmungen 0,06%.

Versuch A. Etwa 45 g lufttrockne Substanz wurden gespalten. Das filtrierte und bis zu einem Liter aufgefüllte Hydrolysat enthielt (3 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 5,618 g Stickstoff. In 970 ccm waren also noch 5,4494 g Stickstoff vorhanden. Auf diese Stickstoffmenge bzw. auf die ihr entsprechende Menge trockenen, aschefreien Eiweißes (34,5 g) sind alle Berechnungen bezogen worden.

Nach Entfernung des Huminstickstoffs I sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 5,00 g Stickstoff vorhanden und von diesen sind (auf Grund einer Bestimmung in 100 ccm) 0,2714 g Ammoniakstickstoff. In 880 ccm sind also noch 4,8729 g Stickstoff vorhanden.

Nach Entfernung des Ammoniaks und des Huminstickstoffs II sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 4,587 g Stickstoff vorhanden, in 980 ccm also noch 4,4953 g.

In einem Liter der Lösung, welche den durch Baryt und Silber fällbaren Stickstoff enthielt (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm), sind 0,8405 g Stickstoff vorhanden, in 960 ccm also 0,8069 g.

In 250 ccm der Histidinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 30 ccm) sind 0,1562 g Stickstoff vorhanden, in 190 ccm also noch 0,1186 g. Die Menge des gewogenen Histidinpikrolonats betrug 0,8730 g.

In 500 ccm der Argininlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) sind 0,4238 g Stickstoff vorhanden, in 460 ccm also noch 0,389 g. Die Menge des gewogenen Argininpikrolonats betrug 2,580 g. Smp. 220°.

In 500 ccm der Lösung, welche den durch Baryt und Silber nicht fällbaren Stickstoff enthält (2 Kjeldahlbest. mit je

10 ccm) sind 3,5095 g Stickstoff vorhanden, in 480 ccm also noch 3,3691 g.

In 250 ccm der Lysinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) sind 0,3888 g Stickstoff vorhanden, in 230 ccm also noch 0,3577 g. Die Menge des gewogenen Lysinpikrats (nach Umkristallisation) betrug 3,480 g. Smp. 246°.

Identifizierung des Arginins als Argininkupfernitrat siehe bei Albumin (Hydrolyse A).

Identifizierung des Lysins als Lysindichlorid. 0,1587 g Substanz gaben nach Carius 0,2107 g AgCl = 0,05212 g Cl = 32,84%. Smp. 192—200°.

$C_6H_{14}N_2O_2 . 2HCl$ verlangen 32,42% Cl.

Versuch B. Etwa 45 g lufttrocknes Globulin II wurden gespalten. Das filtrierte und zu einem Liter aufgefüllte Hydrolysat enthielt (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 5,674 g Stickstoff. In 980 ccm sind also 5,5605 g Stickstoff enthalten. Auf diese Stickstoffmenge bzw. auf die ihr entsprechende Menge trockenen, aschefreien Eiweißes (35,26 g) sind alle Berechnungen bezogen worden.

Nach Entfernung des Huminstickstoffs I sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 5,2945 g Stickstoff vorhanden und von diesen sind (auf Grund einer Bestimmung in 100 ccm) 0,3407 g Ammoniakstickstoff. In 880 ccm sind also noch 5,1545 g Stickstoff vorhanden.

Nach Entfernung des Ammoniaks und des Huminstickstoffs II sind in einem Liter (3 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 4,808 g Stickstoff vorhanden, in 970 ccm also noch 4,6638 g.

In einem Liter der Lösung, welche den durch Baryt und Silber fällbaren Stickstoff enthielt (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) waren 0,785 g Stickstoff vorhanden, in 960 ccm also noch 0,7538 g.

In 250 ccm der Histidinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 30 ccm) sind 0,1457 g Stickstoff vorhanden, in 190 ccm also noch 0,1107 g. Die Menge des gewogenen Histidinpikrolonats betrug 0,8126 g. Smp. 215°.

In 500 ccm der Argininlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) sind 0,415 g Stickstoff vorhanden, in 460 ccm also noch 0,3818 g. Die Menge des gewogenen Argininpikrolonats betrug 2,488 g. Smp. bei 225°.

In 500 ccm der Lösung, welche den durch Baryt und Silber nicht fällbaren Stickstoff enthielt (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) waren 3,834 g Stickstoff enthalten, in 480 ccm also noch 3,6806 g.

In 500 ccm der Lysinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) waren 0,437 g Stickstoff vorhanden, in 460 ccm also noch 0,4020 g. Die Menge des gewogenen Lysinpikrats (nach der Umkristallisation) betrug 3,835 g. Smp. 250°.

Identifizierung des Arginins als Argininkupfernitrat.

0,1292 g Substanz verloren bei 110° 0,0092 g H_2O. = 7,12% Wasser [1]) und hinterließen beim Glühen 0,0178 g CuO = 14,83% CuO (auf kristallwasserfreie Substanz berechnet).

$(C_6H_{14}N_4O_2)_2 . Cu(NO_3)_2 + 3H_2O$ verlangen 9,16% H_2O.

$(C_6H_{14}N_4O_2)_2 . Cu(NO_3)_2$ verlangen 14,86% CuO.

Identifizierung des Lysins als Lysindichlorid siehe Globulin I (Hydrolyse A).

4. Fibrin.

Es enthielt bezogen auf bis zum konstanten Gewicht bei 110° getrocknete und aschefreie Substanz 16,185% Stickstoff.

1,9850 g lufttrockne Substanz verloren bei 110° getrocknet 0,1535 g H_2O. = 7,73%.

1;8520 g lufttrockne Substanz verloren bei 110° getrocknet 0,1415 g H_2O. = 7,64%.

0,5320 g lufttrockne Substanz verbrauchten nach Kjeldahl 56,25 ccm n/10-Schwefelsäure = 78,74 mg Stickstoff = 14,80%.

1,8315 g bei 110° getrocknete Substanz enthielten 0,0170 g Asche = 0,928%.

1,7105 g bei 110° getrocknete Substanz enthielten 0,0160 g Asche = 0,935%.

Versuch A. Etwa 40 g lufttrockne Substanz wurden gespalten. Das filtrierte und zu einem Liter aufgefüllte Hydrolysat enthielt (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 6,1014 g Stickstoff. In 980 ccm waren also 5,9794 g Stickstoff vorhanden. Auf diese Stickstoffmenge bzw. auf die ihr entsprechende Menge trockenen, aschefreien Eiweißes (37 g) sind alle Berechnungen bezogen worden.

Nach Entfernung des Huminstickstoffs I sind in einem

1) Vgl. dazu S. 19.

Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 5,492 g Stickstoff vorhanden und von diesen sind (auf Grund einer Bestimmung in 100 ccm) 0,4067 g Ammoniakstickstoff. In 880 ccm sind also noch 5,3416 g Stickstoff vorhanden.

Nach Entfernung des Ammoniaks und des Huminstickstoffs II sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 4,955 g Stickstoff vorhanden, in 980 ccm also noch 4,8559 g.

In einem Liter der Lösung, welche den durch Baryt und Silber fällbaren Stickstoff enthält (2 Kjeldahlbest mit je 20 ccm), sind 1,087 g Stickstoff vorhanden, in 960 ccm also noch 1,0435 g.

In 250 ccm der Histidinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 30 ccm) sind 0,2194 g Stickstoff vorhanden, in 190 ccm also noch 0,1667 g. Die Menge des gewogenen Histidinpikrolonats betrug 1,327 g. Smp. 222°.

In 500 ccm der Argininlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) waren 0,5802 g Stickstoff vorhanden, in 460 ccm also noch 0,5338 g. Die Menge des gewogenen Argininpikrolonats betrug 3,565 g. Smp. bei 228°. In einem Liter der Lösung, welche den durch Baryt und Silber nicht fällbaren Stickstoff enthält (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm), sind 3,616 g Stickstoff vorhanden, in 480 ccm also noch 3,4714 g.

In 500 ccm der Lysinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) sind 0,5435 g Stickstoff vorhanden, in 460 ccm also noch 0,500 g. Die Menge des gewogenen Lysinpikrats (nach Umkristallisieren) betrug 4,321 g. Smp. 248°.

Identifizierung des Arginins als Argininkupfernitrat.

0,1096 g Substanz verloren bei 110° 0,0045 g H_2O = 4,11% und lieferten beim Glühen 0,0153 g CuO = 14,56% CuO (auf kristallwasserfreie Substanz berechnet).

$(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu(NO_3)_2 + 3H_2O$ verlangen 9,16% H_2O.

$(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu(NO_3)_2$ verlangen 14,86% CuO.

Identifizierung des Lysins. Sie wurde gemeinsam mit den aus Fibrin (Hydrolyse B und C) gewonnenen Präparaten vorgenommen und zwar durch Ueberführung in das Chlorid.

0,1543 g Substanz gaben nach Carius 0,2022 g AgCl = 0,05002 g Cl = 32,42%. Smp. 193—196°.

$C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl$ verlangen 32,42% Cl.

Versuch B. Etwa 40 g lufttrockne Substanz wurden gespalten. Das filtrierte und zu einem Liter aufgefüllte Hydrolysat enthielt (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 6,027 g Stickstoff, in 980 ccm waren also noch 5,9065 g enthalten. Auf diese Stickstoffmenge bzw. auf die ihr entsprechende Menge trockenen aschefreien Eiweißes (36,49 g) sind alle Berechnungen bezogen worden. Nach Entfernung des Huminsticksktoffs I sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 5,4275 g Stickstoff vorhanden und von diesen sind (auf Grund einer Stickstoffbestimmung in 100 ccm) 0,397 g Ammoniakstickstoff. In 880 ccm sind also noch 5,2793 g Stickstoff vorhanden.

Nach Entfernung des Ammoniaks und des Huminstickstoffs II sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 4,791 g Stickstoff vorhanden, 980 ccm enthalten also noch 4,6952 g.

In einem Liter der Lösung, welche den durch Baryt und Silber fällbaren Stickstoff enthält (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) sind 1,235 g Stickstoff vorhanden, in 960 ccm also 1,1856 g.

In 250 ccm der Histidinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 30 ccm) sind 0,282 g Stickstoff vorhanden, in 190 ccm also 0,2138 g. Die Bestimmung des Histidinpikrolonats verunglückte.

In 500 ccm der Argininlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) sind 0,573 g Stickstoff vorhanden, in 460 ccm also noch 0,5272 g. Die Menge des gewogenen Argininpikrolonats betrug 3,377 g. Smp. 225°.

In 500 ccm der Lösung, welche den durch Baryt und Silber nicht fällbaren Stickstoff enthält (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) sind 3,462 g Stickstoff enthalten, in 480 ccm also 3,3235 g.

In 250 ccm der Lysinlösung (4 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) sind 0,4342 g Stickstoff vorhanden, in 210 ccm also noch 0,3648. Die Menge des gewogenen Lysinpikrats (nach Umkristallisieren) betrug 3,624 g. Smp. 245°.

Identifizierung des Arginins als Argininkupfernitrat.

0,0738 g Substanz verloren beim Erhitzen auf 110° 0,0068 g H_2O. = 9,21%

und hinterließen beim Glühen 0,010 g CuO = 14,92 % CuO (bezogen auf kristallwasser freie Substanz).

$(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu(NO_3)_2 + 3H_2O$ verlangen 9,16 % H_2O.

$(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu(NO_3)_2$ verlangen 14,86 % CuO.

Identifizierung des Lysins als Lysindichlorid siehe bei Fibrin (Hydrolyse A).

Versuch C. Etwa 40 g lufttrockne Substanz wurden gespalten. Das filtrierte und zu einem Liter aufgefüllte Hydrolysat enthielt (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 6,01 g Stickstoff, in 980 ccm waren also noch 5,8898 g Stickstoff vorhanden. Auf diese Stickstoffmenge, bzw. auf die ihr entsprechende Menge trockenen aschefreien Eiweißes (36,39 g) sind alle Berechnungen bezogen worden.

Nach Entfernung des Huminstickstoff I, des Ammoniaks und des Huminstickstoff II sind in einem Liter (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) 5,128 g Stickstoff vorhanden, in 980 ccm also noch 5,0254 g.

In einem Liter der Lösung, welche den durch Baryt und Silber fällbaren Stickstoff enthält (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm), waren 1,1978 g Stickstoff enthalten, in 960 ccm also noch 1,1499 g.

In 250 ccm der Histidinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 30 ccm) sind 0,2755 g Stickstoff vorhanden, in 190 ccm also noch 0,2094 g. Die Menge des gewogenen Histidinpikrolonats betrug 1,5494 g.

Eine Argininbestimmung wurde nicht ausgeführt. In 500 ccm der Lösung, welche den durch Baryt und Silber nicht fällbaren Stickstoff enthält (2 Kjeldahlbest. mit je 10 ccm) sind 3,6075 g Stickstoff vorhanden, in 480 ccm also noch 3,4632 g.

In 500 ccm der Lysinlösung (2 Kjeldahlbest. mit je 20 ccm) waren 0,4692 g Stickstoff vorhanden, in 460 ccm also noch 0,4317 g. Die Menge des gewogenen Lysinpikrats (nach Umkristallisieren) beträgt 4,185 g.

Identifizierung des Lysins als Lysindichlorid siehe bei Fibrin (Hydrolyse A).

		Von 100 g N sind enthalten als								100 g trockenes aschefreies Eiweiß enthalten								
		Ammoniak-N	durch Baryt und Silber fällbarer N	Histidin-N bestimmt durch		Arginin-N bestimmt durch		Lysin-N bestimmt durch		Histidin bestimmt durch			Arginin bestimmt durch			Lysin bestimmt durch		
				1. Kjeldahl	2. Wägung	1. Kjeldahl	2. Wägung	1. Kjeldahl	2. Wägung	1. Kjeldahl	2. Wägung	2. in % von 1	1. Kjeldahl	2. Wägung	2. in % von 1	1. Kjeldahl	2. Wägung	2. in % von 1
Serumalbumin	A		20,99	5,32	3,61	8,97	8,54	12,64	9,12	3,24	2,20	67,90	4,60	4,38	95,22	10,88	7,84	72,06
	B	5,18 [1]	20,30	6,11	4,42	9,26	8,76	13,13	9,84	3,72	2,69	72,31	4,75	4,49	94,53	11,29	8,47	75,02
Mittelwert		5,18	20,645	5,71	4,01	9,11	8,65	12,88	9,48	3,48	2,44	70,12	4,67	4,43	94,86	11,08	8,15	73,56
Serumglobulin I	A	5,60	15,39	2,58	1,44	9,48	7,69	8,20	5,66	1,45	0,81	55,85	4,51	3,65	80,93	6,55	4,51	68,86
	B	6,43	15,10	—	—	—	—	8,72	5,82	—	—	—	—	—	—	6,95	4,64	66,78
Serumglobulin II	A	4,98	16,06	3,11	2,29	8,43	7,13	7,74	5,62	1,81	1,33	73,48	4,13	3,50	84,75	6,36	4,62	72,64
	B	6,13	14,86	2,87	2,11	8,18	6,81	8,61	6,13	1,67	1,23	73,65	4,01	3,34	83,29	7,08	5,04	71,19
Mittelwert	Globulin I	6,01	15,24	2,58	1,44	9,48	7,69	8,46	5,74	1,45	0,81	55,85	4,51	3,65	80,93	6,75	4,57	67,71
	Globulin II	5,55	15,46	2,99	2,20	8,30	6,97	8,17	5,87	1,74	1,28	73,56	4,07	3,42	84,03	6,72	4,83	71,87
Fibrin	A	6,80	18,93	3,98	3,17	10,52	8,98	9,86	6,36	2,38	1,90	79,83	5,29	4,52	85,44	8,32	5,37	64,53
	B	6,72	21,77	5,36	—	11,43	9,36	7,97	5,92	3,20	—	—	5,75	4,71	81,90	6,73	4,99	74,14
	C	—	20,75	4,97	3,69	—	—	8,47	6,13	2,97	2,20	74,07	—	—	—	7,15	5,17	72,31
Mittelwert		6,76	20,48	4,77	3,43	10,97	9,17	8,77	6,14	2,85	2,05	71,93	5,52	4,61	83,51	7,40	5,18	70,00

1) Diese Zahl ist nicht ganz zuverlässig (vgl. S 21).

Die in der Literatur verzeichneten Zahlen für den Gehalt der Eiweißstoffe an Hexonbasen sind zum Teil aus den isolierten und gewogenen Verbindungen (Histidindichlorid, Histidinpikrolonat, Argininnitrat, -kupfernitrat, -pikrolonat, Lysinpikrat) zum Teil nur aus dem Stickstoffgehalt der Lösungen, aus denen jene gewogenen Salze sich abgeschieden hatten, berechnet. Nur in wenigen Fällen sind beide Werte angegeben worden. Was die Uebereinstimmung zwischen den gewogenen und den aus dem Stickstoff berechneten Werten betrifft, so wird sie von Weiß für das Histidin (als Pikrolonat gewogen) als zufriedenstellend, für das Arginin (ebenfalls als Pikrolonat gewogen) als sehr gut bezeichnet. Für das Lysin macht er keine Angaben. Nach der allgemeinen Erfahrung, die auch ich bestätigen kann, ist sie hier am wenigsten befriedigend. Für das Arginin (als Nitrat gewogen) haben Kossel und Kutscher[1]) bei der Isolierung aus dem gespaltenen Histon aus Kabeljausperma, einem an dieser Base reichen Eiweiß, völlige Uebereinstimmung gefunden. Mayeda[2]) konnte bei der Spaltung des Amyloids, einem nicht besonders basenreichen Protein, in 6 Versuchen von dem Histidin 80, 100, 90, 100, 100 Prozent des aus dem Stickstoffgehalt berechneten als Pikrolonat zur Wägung bringen, von dem Arginin 80, 98, 90, 100, 100 Prozent ebenfalls als Pikrolonat, von dem Lysin 70, 60, 60, 60, 83 Prozent als Pikrat. Osborne[3]) fand bei der Spaltung pflanzlicher Eiweißstoffe unter Benützung eines etwas abgeänderten Trennungsverfahrens[4]) vom Histidin durch Wägung als analysenreines Dichlorid 75—80 % des Kjeldahlwertes, vom Arginin durch Wägung als analysenreines Kupfernitrat 85—90 %. Ueber das Verhältnis des als Pikrat gewogenen Lysins zum Stickstoffgehalt der Lysinfraktion sagt er nichts. Das Verhältnis zwischen den von mir durch Wägung und durch Rechnung gefundenen Werten

1) A. a. O.

2) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 483 (1909).

3) Osborne, Leavenworth und Brautlecht, a. a. O.

4) Er fällte zunächst nach Kossel und Patten (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 39) den Hauptteil des Histidins mit Quecksilbersulfat aus.

ist nicht so gut wie bei Mayeda, es ist annähernd so wie das von Osborne erhaltene. Ich erhielt durch Wägung von Histidin im Mittel (unter Weglassung einer ganz aus der Reihe fallenden Zahl) 72,6% des Kjeldahlwertes, vom Arginin im Mittel 86,6%, vom Lysin 70,9%.

Wie eingangs bemerkt liegen schon einige Hexonbasenbestimmungen von Serumglobulin (aus Pferdeblut) vor. Die gefundenen Werte, welche sich ebenfalls auf 100 g trockene Substanz beziehen, stelle ich mit den von mir erhaltenen Mittelwerten zusammen.

	Lampel [1]	Lampel u. Skraup [2]	Lock
Histidin (als Dichlorid gewogen)	3,4	1,7	1,04
Arginin („ Nitrat „)	2,9	3,7	3,52
Lysin („ Pikrat „)	4,2	4,3	4,8

Die Zahlen von Lampel für Histidin und Arginin sind offenbar nicht richtig.

Ein Blick auf die große Tabelle zeigt, daß die Analysen der beiden Globulinfraktionen keine Unterschiede offenbarten, also auch zu keiner Beantwortung der Frage nach der Einheitlichkeit des Globulins geführt haben. Eine solche hätte natürlich nur die Feststellung einer quantitativ verschiedenen Beteiligung der Diaminosäuren an dem Aufbau der beiden Fraktionen bringen können. Immerhin hat die Wahrscheinlichkeit, daß in dem Globulin ein Gemenge wesentlich verschieden aufgebauter Eiweißstoffe vorliegt, durch diese Befunde weiterhin abgenommen.

Für das Fibrin (aus Rinderblut) hat Reinbold [3]) den Ammoniakstickstoff und den Hexonbasenstickstoff bestimmt und jenen zu 1,47%, diesen zu 3,39% gefunden. Die entsprechenden von mir erhaltenen Werte sind 1,10% und 3,97% [4]).

Für das kristallisierte Serumalbumin liegen von Haus-

1) A. a. O.

2) A. a. O.

3) Zentralblatt f. d. ges. Physiologie und Pathologie des Stoffwechsels 10, 401 (1909).

4) Durch Addition der für Histidin, Arginin und Lysin gewonnenen Werte erhalten.

mann[1]) und von Gümbel[2]) Bestimmungen des Ammoniaks und des Hexonbasenstickstoffs vor. Gümbel fand für ersteren 0,95 %, für letzteren 4,86 % (Mittel aus 5,07 % und 4,66 %). Meine entsprechenden Werte sind 0,85 % und 4,04 % [3]).

1) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 95 (1899); Bd. 29, S. 136 (1900).
2) Beiträge zur chem. Physiologie und Pathologie Bd. 5, S. 297 (1904).
3) Siehe Anm. 4 S. 33 unten.